

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
ВИРУСА ОМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ НА ОСНОВЕ
АНАЛИЗА ПОЛНОГЕНОМНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Мазурина Е.А., Ковалёв С.Ю.

Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России

Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

l.mazurina2011@yandex.ru, sergey.kovalev@urfu.ru

Аннотация. Вирус омской геморрагической лихорадки (OHFV) – возбудитель опасной природно-очаговой инфекции. В GenBank зарегистрировано четыре полных генома вируса, что недостаточно для установления генетического разнообразия OHFV и понимания его эволюционной истории. В настоящей работе впервые определены 15 новых геномов OHFV. Полученные данные позволили проанализировать молекулярную изменчивость и установить генетическую структуру OHFV. Результаты показали, что генетическое разнообразие OHFV значительно шире, чем считалось ранее, а популяция вируса представлена как минимум тремя субтипами, а не двумя как считалось ранее.

Ключевые слова: Вирус омской геморрагической лихорадки, Филогенетический анализ, Полногеномные последовательности, Генетическое разнообразие

**MOLECULAR VARIABILITY AND GENETIC STRUCTURE OF OMSK
HEMORRAGIC FEVER VIRUS, BASED ON ANALYSIS OF THE
COMPLETE GENOME SEQUENCES**

Mazurina E., Kovalev S.

Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

Abstract. Omsk hemorrhagic fever virus (OHFV) is the causative agent of a dangerous natural focal infection. Four complete genomes of the virus are registered in GenBank, which is not enough to establish the genetic diversity of OHFV and understand its evolutionary history. In this work, 15 new OHFV genomes have been identified for the first time. The data obtained made it possible to analyze the molecular variability and establish the genetic structure of OHFV. The results showed that the genetic diversity of OHFV is much broader than previously thought, and the virus population is represented by at least three subtypes, not two as previously thought.

Key words: Omsk hemorrhagic fever virus, Phylogenetic analysis, Complete genome sequences, Genetic diversity

ВВЕДЕНИЕ

Омская геморрагическая лихорадка является опасной природно-очаговой инфекцией, вызывающей острые лихорадочные проявления геморрагии. Она распространена в четырех областях Западной Сибири: Омской, Тюменской, Курганской и Новосибирской. Возбудителем инфекции является вирус омской геморрагической лихорадки (ОНФV), который принадлежит семейству *Flaviviridae* (род *Flavivirus*) и филогенетически близок к вирусу клещевого энцефалита (ТБЕV). ОНФV был выделен в 1947 году [1].

Главный путь передачи вируса человеку - контакт с тканями и кровью инфицированных ондатр, кроме того, возможно заражение в результате присасывания клещей, а также через контаминированную воду и представителей околоводной фауны [2].

Основной проблемой в изучении генетической изменчивости и понимания эволюционной истории ОНФV является недостаточное количество полногеномных последовательностей. В настоящее время в GenBank зарегистрировано четыре генома вируса, которые не отражают его реального разнообразия в природе. Общепринято считать, что в вирусная популяция ОНФV состоит из двух субтипов, однако отдельные авторы отмечают возможность существования третьего субтипа [3, 4].

Целью настоящего исследования было изучение генетического разнообразия ОНФV на основе 15 новых полногеномных последовательностей вируса, штаммы которого были выделены в разное время из эндемичных областей Западной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для полногеномного секвенирования были выбраны 16 штаммов ОНФV из коллекции вирусов ФБУН «Омский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Штаммы были изолированы в период с 1948 по 2007 год. Также в работу были взяты четыре полногеномные последовательности, имеющиеся в GenBank (Таблица 1).

РНК вируса выделяли из суспензий головного мозга мышей с использованием набора AmpliSens RIBO-PREP, и проводили обратную транскрипцию набором AmpliSens Reverta-L. Полимеразная цепная реакция проводилась в объеме 25 мкл., набором реактивов (ООО «АмплиСенс», Россия) на амплификаторе «Veriti™ Thermal Cycler».

Секвенирование вирусного генома проводили по двух цепям на генетическом анализаторе ABI 3500 с использованием протокола производителя. Сборка полного генома вируса была выполнена программой SeqScape v.3.0.

путем объединения последовательностей ПЦР-фрагментов. Последовательности генома OHFV были депонированы в GenBank с номерами доступа от MT354614 до MT354629 (Таблица 1).

Множественное выравнивание полученных последовательностей было выполнено при помощи программного модуля MUSCLE, входящей в состав пакета программ MEGA, версия 10 [5].

Филогенетическое древо построено методом Neighbor-Joining для 20 полных последовательностей генома OHFV с использованием модели p-distance [5], в программе MEGA X [6]. В качестве аут-группы был взят геном TBEV дальневосточного субтипа (штамм SofjinKSY_JF819648). Филогенетические связи между различными изолятами OHFV были подтверждены с помощью бутстрэпного анализа со значениями > 90%.

Таблица 1 – Данные о полногеномных последовательностях штаммов OHFV.

№	Штамм	GenBank Номер доступа	Год изоляции	Источник	Длина генома (nt)	Место изоляции	Ссылки
1	Kubrin	AY438626	1947	<i>Homo sapiens</i> (кровь)	10787	Омская область, Саргатский район	Li et al., 2003
2	Bogolubovska/Kubrin	NC005062	1947	<i>H. sapiens</i> (кровь)	10787	Омская область, Саргатский район	Lin et al., 2002
3	Guriev	AB507800	1948?	<i>H. sapiens</i> (кровь)	10888	Неизвестно	Yoshii et al., 2009
4	Bogolubovka	AY323489	1948	<i>Dermacentor marginatus</i>	10609	Омская область, окрестности Марьяновки	Charrel et al., 2003
5	P-15/2213	MT354615	1990	<i>Ondatra zibethicus</i>	11085	Новосибирская область, окрестности Усть-Тарки	Эта работа
6	OZ-97/11285	MT354616	2004	<i>O. zibethicus</i>	11083	Омская область, Называевский район	Эта работа
7	OZ-96/11293	MT354617	2004	<i>O. zibethicus</i>	11083	Омская область, Называевский район	Эта работа
8	M-19/5099	MT354618	1991	<i>O. zibethicus</i>	11085	Новосибирск, Усть-Тарка, окрестности Венгерово	Эта работа
9	Kabyrdak-39/10944	MT354619	1962	<i>D. reticulatus</i>	10944	Омская область, окрестности Крутинки	Эта работа
10	G17/10783	MT354620	1991	mosquitos	11084	Новосибирская область, окрестности Венгерово	Эта работа
11	Veselovka-753/11084	MT354621	1963	<i>O. zibethicus</i>	11084	Новосибирская область, окрестности Краснозерского	Эта работа
12	B-41/9687	MT354622	2000	<i>O. zibethicus</i>	11085	Омская область, Крутинка, озеро Салтаим-Тенис	Эта работа
13	B-37/9866	MT354623	1999	<i>O. zibethicus</i>	11085	Омская область, Крутинка, озеро Салтаим-Тенис	Эта работа
14	B-30/10146	MT354624	1990	<i>O. zibethicus</i>	11085	Новосибирская область, окрестности поселка Чаны	Эта работа

15	B-1/10186	MT354 625	1992	<i>O. zibethicus</i>	11084	Курганская область, Частозерский район, озеро Щучье	Эта работа
16	pr.1007/10817	MT354 626	1991	<i>Microtus oeconomus</i>	11085	Новосибирская область, окрестности Венгерово	Эта работа
17	362B1/362B1	MT354 627	2007	<i>O. zibethicus</i>	11085	Омская область, Крутинка, озеро Салтаим-Тенис	Эта работа
18	42M/9722	MT354 628	1999	<i>O. zibethicus</i>	11085	Омская область, Крутинка, озеро Салтаим-Тенис	Эта работа
19	17N/11153	MT354 629	2002	<i>O. zibethicus</i>	11085	Омская область, окрестности Крутинки	Эта работа

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были определены нуклеотидные последовательности генома пятнадцати штаммом ОНФV [7]. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генома девятнадцати штаммов выявил в генетической структуре ОНФV три субтипа. Статистическая достоверность расчётов, на основании которых была построена дендрограмма, обеспечена с помощью процедуры Bootstrap (1000 повторов). Первый субтип представлен наибольшим количеством штаммов (n=13). Второй субтип - двумя штаммами. Третий субтип, выделен в нашем исследовании впервые, к нему отнесены четыре полногеномные последовательности вируса (Рис. 1).

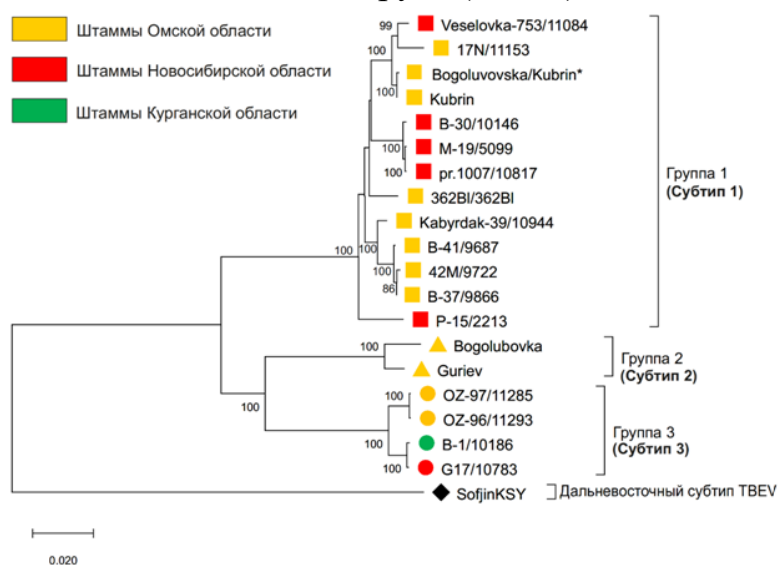


Рисунок 1 – Дендрограмма, построенная на основании филогенетического анализа кодирующих последовательностей ОНФV.

Таким образом нами впервые показано, что популяция ОНФV представлена как минимум тремя субтипами, а не двумя как считалось ранее.

Величина межгрупповой дистанции по нуклеотидной последовательности (рассчитанной по модели p-distance) для 3 представленных субтипов находится в диапазоне от 8,9 до 11,11% (Таблица 2).

Таблица 2 – Величины межгрупповых дистанций для субтипов ОНФV и прототипных штаммов ТBEV. Серым цветом выделены дистанции, рассчитанные по нуклеотидным последовательностям; в белых ячейках представлены дистанции, рассчитанные по аминокислотным последовательностям

	Субтип 1	Субтип 2	Субтип 3
Субтип 1	-	3,40 ± 0,29 %	3,44 ± 0,28 %
Субтип 2	11,11 ± 0,32 %	-	2,94 ± 0,28 %
Субтип 3	11,03 ± 0,32 %	8,91 ± 0,35 %	-
SofjinKSY (JF819648) TBEV-FE	20,32 ± 0,35%	20,40 ± 0,34%	20,50 ± 0,32%
Neudoerfl (U27495) TBEV-Eu	19,90 ± 0,30%	20,09 ± 0,27%	20,22 ± 0,27%
Zausaev (AF527415) TBEV-Sib	19,92 ± 0,30%	20,21 ± 0,28%	20,18 ± 0,31%

Величины генетических дистанций между штаммами в пределах субтипов ОНФV представлены в таблице (Таблица 3).

Таблица 3 – Величины внутрисубтиповых дистанций ОНФV рассчитанные по полногеномным нуклеотидным последовательностям

Субтип 1	Субтип 2	Субтип 3
1,95 ± 0,18	1,67 ± 0,13	0,93 ± 0,14

Тот факт, что величина дистанций внутри субтипов ОНФV не превышает 2%, говорит об относительной высокой генетической однородности штаммов в пределах субтипа.

Для субтипов ОНФV дистанции с прототипными штаммами ТBEV составили ≈ 20% (от 19,90 до 20,50). Следовательно, равноудаленность субтипов ОНФV от ТBEV, может свидетельствовать о их независимом происхождении.

Генетические дистанции по консервативным генам (ген E и NS5), близки к межгрупповым дистанциям, рассчитанным для полного генома. Для гена E эти дистанции составляют 11,38% между 1 и 2 группами, 11,11% между 1 и 3, и 9,49% между 2 и 3 группами. Для гена NS5 те же дистанции составляют: 10,56%, 10,82%, 7,83% соответственно.

Тот факт, что ко второму субтипу отнесены всего 2 штамма, выделенные в 40-х годах прошлого века, позволяет предполагать, что штаммы этого субтипа, по всей вероятности, уже исчезли. Отсутствие современных полевых исследований и также недостаток данных о циркуляции ОНФV в природных очагах, оставляют вопрос о существовании штаммов, относящихся ко второму субтипу, открытым.

При анализе аминокислотных последовательностей полипротеина у штаммов всех трёх субтипов было обнаружено 250 полиморфных аминокислотных позиций (7,32% процента от общего количества аминокислот в полипротеине вируса). Из них 93 позиции оказались уникальными для одного из трёх субтипов. Еще четыре аминокислотные позиции в положениях 156, 742, 1295, 2131 являются уникальными, для каждого субтипа. Данная находка позволит устанавливать принадлежность штаммов к тому или иному субтипу без секвенирования полного генома вируса.

Также нами обнаружено, что в вариабельном фрагменте 3'-нетранслируемой области генома (UTR) некоторых штаммов наблюдается делеция, не захватывающая структурную часть 3'-UTR [7]. Феномен потери фрагмента в вариабельной области 3'-UTR (≈ 400 н.п.) описан для других клещевых флавивирусов и, по всей видимости, ОНФV не является исключением [8]. Такая делеция наблюдается исключительно у штаммов, которые имеют достаточно длинную пассажную историю. Это позволяет сохранить уровень вирулентности, сходный с вирусами дикого типа [8].

Полученные в настоящем исследовании данные расширяют наши представления о генетическом разнообразии ОНФV, дают возможность проведения мониторинга за возбудителем на основе молекулярно-генетических маркеров, что в итоге позволит внести ясность в эволюционную историю этого вируса.

Библиографический список

1. Lvov D. K. Omsk hemorrhagic fever //The arboviruses: epidemiology and ecology. – 1988. – V. 3. – P. 205-216.
2. Růžek D. et al. Omsk haemorrhagic fever //The Lancet. – 2010. – V. 376. №. 9758. – P. 2104-2113.
3. Clarke D. H. Further studies on antigenic relationships among the viruses of the group B tick-borne complex //Bulletin of the World Health Organization. – 1964. – V. 31. №. 1. – P. 45.
4. Корнилова К.А., Гагарина А.В., Чумаков М.П. Сравнительная характеристика штаммов вируса омской геморрагической лихорадки, выделенных из различных объектов природного очага // Вопросы вирусологии. - 1970 г. - Т. 15. №. 2. - С. 232.
5. Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. – Oxford university press, 2000.
6. Kumar S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms //Molecular biology and evolution. – 2018. – V. 35, №. 6. – P. 1547-1549.

7. Kovalev S. Y., Mazurina E. A., Yakimenko V. V. Molecular variability and genetic structure of Omsk hemorrhagic fever virus, based on analysis of the complete genome sequences //Ticks and Tick-borne Diseases. – 2021. – T. 12. – №. 2. – C. 101627.

8. Mandl C. W. et al. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus //Journal of virology. – 1998. – V. 72, №. 3. – T. 2132-2140.